

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-260959
(43)Date of publication of application : 12.10.1993

(51)Int.Cl. C12N 5/08
C12N 11/02
C12N 11/12
// A61K 31/715
A61K 37/12
(C12N 5/08
C12R 1:91)

(21)Application number : 04-062749
(22)Date of filing : 19.03.1992

(71)Applicant : TERUMO CORP
(72)Inventor : KOIDE MIKIO

(54) SUBSTRATE FOR CULTURING CELL**(57)Abstract:**

PURPOSE: To provide the cell culture substrate high in the cell affinity and the cell-multiplying property and permitting to readily take out the multiplied cells.
CONSTITUTION: The substrate for culturing cells is characterized by comprising at least two layers composed of a hydrophilic porous membrane and of coacervate solution drops comprising a modified collagen and a water-soluble polysaccharide.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C): 1998,2000 Japanese Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-260959

(43)公開日 平成5年(1993)10月12日

(51)Int.Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 5/08				
11/02				
11/12				
// A 6 1 K 31/715		8314-4C		
		7236-4B		
			C 1 2 N 5/ 00	E
			審査請求 未請求 請求項の数 1(全 5 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-62749

(22)出願日 平成4年(1992)3月19日

(71)出願人 000109543

テルモ株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

(72)発明者 小山 幹夫

神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

(54)【発明の名称】 細胞培養用基材

(57)【要約】

【目的】細胞との親和性、増殖性が高く、増殖した細胞を容易に取り出せる細胞培養用基材を提供する。

【構成】親水性を付与した多孔質膜と、変性コラーゲンおよび水溶性多糖類からなるコアセルベート液滴の少なくとも2層からなることを特徴とする細胞培養用基材である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 親水性多孔質膜と、変性コラーゲンおよび水溶性多糖類からなるコアセルベート液滴の少なくとも2層からなることを特徴とする細胞培養用基材。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は細胞培養用基材に関するもので、細胞の増殖の促進を図れる細胞培養用基材に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、医学、生物学の分野において、体細胞を生体的(in vivo)に、あるいは試験管内的(in vitro)に培養することに関心が持たれている。例えば熱傷、採皮創および皮膚剝削創、外傷性皮膚欠損創等の疾患ないし創傷により皮膚組織の損失、特に広範な皮膚損失を被った場合、患部における感染および体液の過度の損失により直ちに生命の危険にさらされる虞れが生じるゆえ、迅速な組織の修復が望まれるところである。このような患部に対する処置としては本人に正常な部位の皮膚を取り、自家移植することが現在最善の策とされているが、自家移植が常に適用可能であるとは限らず、例えば欠損部が広範にわたる場合などは非常に困難なものとなり、適用可能である場合も一度にすべての欠損部に移植することは不可能であり、長期間にわたり幾度となく移植を繰り返す必要があった。

【0003】また、近年培養移植法あるいは培養皮膚とも言える皮膚に近い材料の移植法が行われてきている。これは重度の患者を対象として、患者の残された正常部位の皮膚を採取して、単離した細胞を試験管内で培養を行いもとの細胞の数十倍から数百倍に増殖したのち、被覆膜とともに患者の創傷部位に移植し、表皮化を形成させ治癒を図るものである。この方法を臨床に応用した例としてガリコ(G. G. Gallico et al)の研究(ニュー イングランド ジャーナルオブ メディシン(New Eng. J. Med.), 第311巻, 第7号, 448~451ページ(1984年))がある。

【0004】さらに、皮膚は唯一直接外界に接している臓器であり、最下層に分裂能を有する基底細胞層、その上層にある基底細胞が徐々に分化してできた有棘層・顆粒層そして最外層の角質層から成り立っている。基底細胞は分化するにつれ、細胞が扁平化し細胞質中のケラチンを蓄積し、最終的には完全にケラチンとなり外界に排出される。このように皮膚のような上皮系の基底細胞には真皮側から栄養を補給し角質層に向けて排泄するという細胞内分極が存在する。このような特性から表皮基底細胞はプラスチックシャーレ上で培養すると基材との接触面より栄養補給ができず、培養をつづけていくと徐々に基材から剥離し死んでしまう。従って、この細胞内分極という表皮基底細胞の特性を生かすためには、細胞が

接着している部分から栄養を摂取できなければならない。このため、物質透過性を持つ細胞培養用基材が望まれる。コラーゲンからなる膜では物質透過性のないコラーゲン基材(プラスチックシャーレにコラーゲンをコートしたもの)に比べ、表皮基底細胞の長期保持が可能であったという報告がある(K. Yoshizato, et al, ジャーナル オブ セル サイエンス(J. Cell Sci), 91, 491~499 (1988))。しかしコラーゲン膜は栄養を補給できるだけの物質透過性もなく、また物理的に不安定であり、さらに表皮基底細胞が産生するコラーゲナーゼにより分解する可能性がある。それに対して人工材料による細胞培養用基材はコラーゲン膜の欠点を補うものとして市販されているが、表皮基底細胞の接着性が低く、人工材料において物質透過性膜の利点を補うものではない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上述の如き問題点である基材の物質の透過性を改善し細胞の生着性が高く、増殖性の高い細胞培養用基材を提供することを課題としてなされたものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】上記課題は親水性多孔質膜と、変性コラーゲンおよび水溶性多糖類からなるコアセルベート液滴の少なくとも2層からなる細胞培養用基材によって解決される。

【0007】本発明の親水性多孔質膜と、変性コラーゲンおよび水溶性多糖類からなるコアセルベート液滴の少なくとも2層からなることを特徴とする細胞培養用基材は、細胞生着面に変性コラーゲンおよび水溶性多糖類からなるコアセルベート液滴が存在するために細胞との親和性が高く、多孔質膜を基体として用いるために膜を介しての物質交換が容易に行え、細胞増殖性が高まる。さらに表皮基底細胞を培養して培養表皮シートを得るためには、ディスパーゼ等の酵素を使用して簡単に基材から剥離することができる。

【0008】本発明では親水性多孔質膜と、変性コラーゲンおよび水溶性多糖類からなるコアセルベート液滴の少なくとも2層とるものであるが、この2層という意味にはコアセルベート液滴が親水性多孔質膜上に層状をなしている状態の他に、液滴として分散している状態も含むものである。

【0009】また、本発明は親水性多孔質膜として、疎水性多孔質膜の表面に親水性ポリマーを化学的修飾して親水化したものを用いることが望ましく、機械的強度が高く取り扱いが容易になる。

【0010】さらに、本発明は疎水性多孔質膜の平均孔径は0.01~1.0 μm であると、物質透過性が維持され、また、必要以上の物質の流出を防ぐことができるので好ましい。そのような多孔質膜に基材としてポリオレフィン、ハロゲン化ポリオレフィンなどのオレフィ

ン系樹脂あるいは、ナイロン、ポリサルフォン、ニトロセルロースなどを用いることができる。

【0011】また、疎水性多孔質膜に親水性を付与するための化学的修飾方法としてプラズマ開始表面グラフト重合法などが可能である。

【0012】本発明における変性コラーゲンは牛真皮由来のコラーゲンをブロクターゼまたはペプシン等の酵素で消化処理して抗原基テロペプチドを除去してアテロコラーゲンとし、さらにこれを37～90℃の温度に加熱して変性させたものが望ましく、この変性条件は多糖類とのコアセルベート液滴形成に非常に影響を与える。変性温度と変性処理時間の程度により、コラーゲン分子の螺旋繊維（ヘリックス）の巻き戻しの程度、pH変化に対する反応性等が異なる。そのために変性の程度を適度に調整して、水溶性多糖類希薄水溶液と混合したときにのみコアセルベート液滴を形成することができる。さらに前記水溶性多糖類としてはムコ多糖類、特に酸性ムコ多糖類であるコンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、アルギン酸などが挙げられる。これらの多糖類は水によく溶けるためにコアセルベート液滴作成に適している。

【0013】本発明で用いる疎水性多孔質膜としてポリプロピレンを用いた親水性疎水性多孔質膜は次のようにして製造される。まず、ポリプロピレン粉末に所定量の流動パラフィン及び結晶核形成剤を加えて熔融混練し、ペレット化する。このペレットを150～200℃で溶融し、Tダイ付きの押出機により押し出し、冷却固定化液中に導き冷却固化してフィルムにし、該フィルム中の流動パラフィンの抽出を行い、135℃程度の空气中で約2分間熱処理を施し、ポリプロピレン製多孔質膜を得る。この多孔質膜にメトキシエチルアクリレートをプラズマ開始表面グラフト重合し、親水化されたポリプロピレン製多孔質膜を得ることができる。得られた親水化されたポリプロピレン製多孔質膜は培地に浸すと半透明になり、光学顕微鏡を用いて細胞の形態を観察することができるようになる。

【0014】また、本発明で用いるコアセルベート液滴は次のようにして製造される。変性コラーゲン水溶液と水溶性多糖類水溶液を変性コラーゲン1重量部に対して水溶性多糖類0.05～1重量部の割合で混合し、塩酸等を用いてpHを酸性に調節し、白濁したコアセルベート液滴を得ることができる。混合時の変性コラーゲン水溶液と水溶性多糖類の総量は5～50（W/W）%が好ましく、より好ましくは10～30（W/W）%である。この範囲に総量があるとき、コアセルベート液滴の収量が増大する。

【0015】そして、本発明の細胞培養用基材を作製するには前述した親水化した多孔質膜にコアセルベート液滴をコーティングしてクリーンベンチ内で風乾することによって得られる。多孔質膜にコアセルベート液滴をコ

ーティングしても、コーティングの厚さに関係なく、グルコース（分子量180）、ビタミンB₁₂（分子量1,355）、イヌリン（分子量5,200）のような溶質を透過することができる。

【0016】また、疎水性多孔質膜を親水化したものを用いる代わりに、親水性の多孔質膜を用いてもよい。素材としてはポリウレタンなどがあげられる。

【0017】

【実施例】以下実施例によって本発明をさらに具体的に説明する。

【0018】

【実施例1】

①コアセルベートの作成

アテロコラーゲンを0.3（W/V）%となるように蒸留水で膨潤させてアテロコラーゲン溶液とし、この水溶液を室温になじませた後、60℃に保ったオープン内にて約2時間加熱操作を行ない変性コラーゲンを得る。この変性コラーゲンは変性温度（37℃）以上に保っておく。なお、この処理温度時間で得られた変性コラーゲンは冷却後にヘリックス構造の一定の割合で再生できる範囲内のものである。このようにして得られた変性コラーゲンのヘリックス含量は約40%であった。一方、コンドロイチン-6-硫酸を1（W/V）%となるように蒸留水に溶かし、コンドロイチン-6-硫酸として得られているものは水に溶解後陽イオン交換樹脂でNa部分を水素イオンで置換しておく。混合した時の物質総量の割合は変性コラーゲン：コンドロイチン-6-硫酸は9：1であった。混合後1規定の塩酸を用いてpHを調整を行い、pHを下げていくに従い白濁を生じ、コアセルベート液滴が形成された。

【0019】②親水化ポリプロピレン多孔質膜の作成
メルトフローインデックスが30及び0.3のポリプロピレン混合物（混合重量比100：40）100重量部当たり、400重量部の流動パラフィン（平均分子量324）及び0.3重量部の結晶核形成剤としての1,3,2,4-ビス（p-エチルベンジリデン）ソルビールを二軸型押出機により熔融混練し、ペレット化した。このペレットを上記二軸型押出機を用いて150～200℃で溶融し、スリット0.6mmのTダイより空气中に押し出しフィルム状にし、このフィルム状物をTダイ直下に置かれたガイドローラーによって冷却固定化した後巻取る。この巻取ったフィルム状物を一定寸法に切断し、縦横両方向に固定し、1,1,2-トリクロロ-1,2,2-トリフルオロエタン中に10分間計4回浸漬して、フィルム状物中で2分間熱処理を行って平均孔径0.45μm、膜厚130μmのポリプロピレン製多孔質膜を得た。この膜にメトキシエチルアクリレートをプラズマ開始表面グラフト重合し、親水化されたポリプロピレン製多孔質膜を得た。

【0020】③細胞培養用基材の作成

上記②で作成した得られた親水化されたポリプロピレン膜に上記①で作成したコアセルベート液滴をコーティングした後、クリーンベンチ内で風乾した。さらに真空下で1時間真空に晒し、その後温度を下げ、親水化されたポリプロピレン膜にコアセルベート液滴がコートされた細胞培養用基材を作成した。

【0021】

【実施例2】

④親水性ニトロセルロースの作成

市販のニトロセルロース（東洋濾紙製）にメトキシエチルアクリレートをプラズマ開始表面グラフト重合して親水化し、親水化されたニトロセルロースを得た。

【0022】⑤細胞培養用基材の作成

上記④で得られた親水化されたニトロセルロースに実施例1の①で調整したコアセルベート液滴をコーティングした後、クリーンベンチ内で風乾した。さらに真空下で1時間真空に晒し、さらに温度を140℃に上げ、24時間真空状態に保ち、その後、温度を下げ、親水化されたニトロセルロースにコアセルベート液滴がコートされた細胞培養用基材を作成した。

【0023】（表皮細胞の培養試験）実施例1で得られたコアセルベート液滴をコートした親水化ポリプロピレン製多孔質膜と、実施例2で得られたコアセルベート液滴をコートした親水化ニトロセルロース膜と、比較例として実施例1の②で作成した親水化ポリプロピレン製多孔質膜及び、実施例2の④で作成した親水化ニトロセルロース膜のそれぞれの膜を23mmφに打ち抜き、70%エタノールで消毒後、12穴プレートにOリングで固

定した。ラット由来のニューボーンラットケラチノサイト（New born Rat Skin Keratinocyte（クラボウ株式会社製）（凍結品）を解凍し1200r.p.mで5分間遠心分離した。10%FBS（株式会社大日本製薬）を含むDME培地にサスペンションした後、 1×10^5 cells/cm²で12穴プレート上に播種した。一定期間（3日間）培養した後、細胞数をカウントした。結果を図1に示した。

【0024】図1から親水性を付与された疎水性多孔質膜と比べて、本発明の親水性多孔質膜と、変性コラーゲンおよび水溶性多糖類からなるコアセルベート液滴の少なくとも2層からなる細胞培養用基材では細胞の増殖率が高く、細胞培養に優れることがわかる。

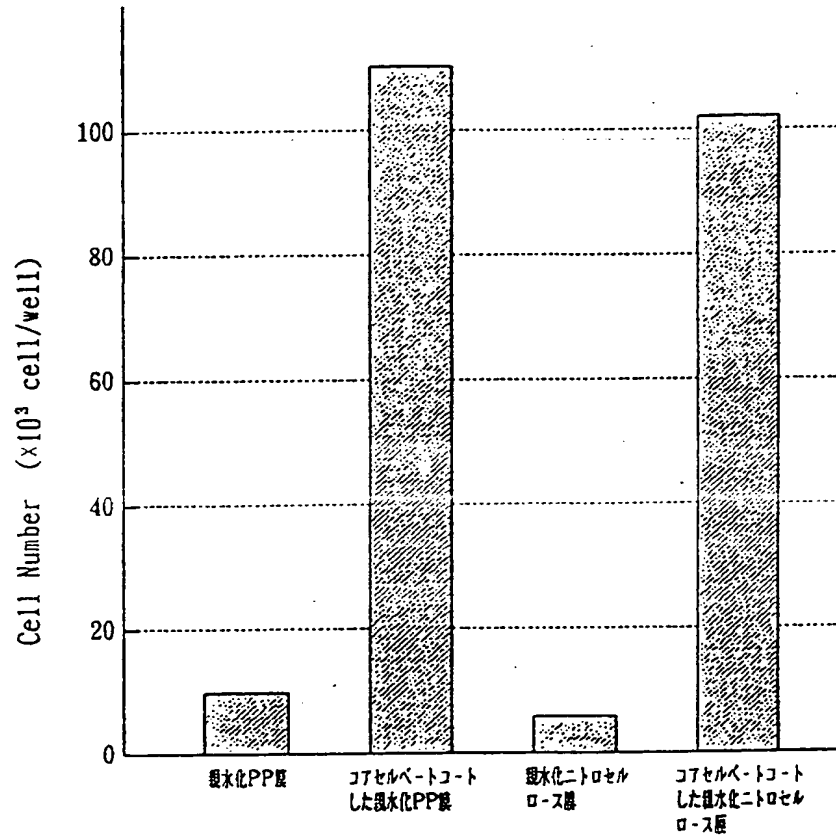
【0025】

【発明の効果】本発明の親水性多孔質膜と、変性コラーゲンおよび水溶性多糖類からなるコアセルベート液滴の少なくとも2層からなる細胞培養用基材は、細胞生着面に変性コラーゲンおよび水溶性多糖類からなるコアセルベート液滴が存在するために細胞との親和性が高く、多孔質膜を基体として用いるために膜を介しての物質交換が容易に行え、細胞増殖性が高まる。さらに表皮基底細胞を培養して培養表皮シートを得るためには、ディスパーゼ等の酵素を使用して簡単に基材から剥離することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】基材とその基材上で培養された表皮基底細胞の数との関係を示している。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

A 61 K 37/12

(C 12 N 5/08

C 12 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

8314-4C